

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

EP 00 / 1 1 6 2 6



REC'D 29 JAN 2001

WIPO

PCT

EJU

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

199 56 620.8

Anmeldetag:

25. November 1999

Anmelder/Inhaber:

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Erfassung von Fluoreszenzerschei-
nungen in einem Mikroskop

IPC:

G 01 J, G 01 N, G 02 B

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.München, den 21. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

Das dargestellte Verfahren betrifft die konfokale und die 2-Photonen Fluoreszenzmikroskopie [Goeppert][Wilson]. Beide Verfahren werden als bekannt vorausgesetzt.

Sowohl die konfokale Fluoreszenzmikroskopie als auch die 2-Photonen - Mikroskopie werden mit dem unten dargestellten Verfahren dahingehend verändert, daß ein zusätzlicher Kontrastparameter möglich wird: die Fluoreszenz-Lebensdauer.

Zeitaufgelöste Fluoreszenz bzw. die Nutzung der Lebensdauer als Kontrastparameter in der konfokalen/2-Photonen mikroskopie kann auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden - durch die Detektion im Zeit-Raum (time-domain detection) und die Detektion im Frequenz-Raum (frequency-domain detection).

Bei der **Time-domain Detektion** [Wabnitz] [Gröbler] wird eine Fluoreszierende Probe mittels gepulster Lichtquelle zur Fluoreszenz angeregt und die Fluoreszenz-Emission entweder mittels Zeitkorrelierter Einzel-Photonenzählung (Time-Correlated-Single-Photon Counting, TCSPC) [Müller] [Han] oder Detektion mittels Verstärkungs-Zeitfenster im Detektor (Time-gated detection) [Schbg] [Cubeddu]] [Dowling] zeitaufgelöst detektiert.

Bei der **Detektion im Frequenzraum** wird eine fluoreszierende Probe/Präparat mit einer aktiv modulierten oder auch (z.B. passiv modengekoppelten) gepulsten Lichtquelle angeregt. Da jede beliebige Modulation der Anregung durch eine Fourieranalyse in sinusförmige Komponenten zerfällt, genügt die Betrachtung einer sinusförmigen Anregung. Die Detektion im Frequenz-Raum beruht auf der Verzögerung der Fluoreszenz-emission um eine Phase φ und einer Änderung der Modulationstiefe M verglichen mit dem Anregungslicht in Abhängigkeit von der Modulationsfrequenz ω ($=2 \pi f_{mod}$) und der Lebensdauer τ .

$$\varphi = \text{atan}(\omega \tau) \quad (1)$$

$$M = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}} \quad (2)$$

Das resultierende Fluoreszenz-Signal oszilliert mit der Modulationsfrequenz, ist aber phasenverschoben und demoduliert. Für typische Fluoreszenz-Lebensdauern im

Bereich $\tau = 1...10$ ns sind Modulationsfrequenzen im Bereich $f_{mod} = 10...100$ MHz ausreichend.

Da es im allg. nicht sinnvoll ist das Fluoreszenzsignal bei solch hohen Modulationsfrequenzen abzutasten, verwendet man einen Frequenz-Mischungsprozeß zur Erfassung des Signals. Zum Mischen eignet sich z.B. jedes Nachweiselement mit modulierbarer Verstärkung.

Im wesentlichen werden zwei Vorgehensweisen unterschieden – der **Homodyne** und der **Heterodyne** - Nachweis.

Um das Prinzip zu verstehen betrachtet man allg. zwei "Signale" S_1, S_2 (z.B. S_1 modulierte Anregung, S_2 modulierte Verstärkung).

$$\begin{aligned} S_1 &= A_0 + A_1 \cos(\omega_a t + \alpha) \\ S_2 &= B_0 + B_1 \cos(\omega_b t + \beta) \end{aligned} \quad (3)$$

Multiplikation führt zu

$$\begin{aligned} S_1 S_2 &= A_0 B_0 + A_0 B_1 \cos(\omega_b t + \beta) + B_0 A_1 \cos(\omega_a t + \alpha) + \\ &A_1 B_1 \left\{ \cos((\omega_a + \omega_b)t + (\alpha + \beta)) + \cos((\omega_a - \omega_b)t + (\alpha - \beta)) \right\} \end{aligned} \quad (4)$$

Homodyne-Nachweis

Ist $\omega_a = \omega_b$ (homodyne) wird durch den Mischungsprozess der "Signale" S_1 and S_2 die 2te Harmonische und eine frequenzunabhängige Komponente erzeugt. Ein Tiefpassfilter führt zur Unterdrückung der Komponenten bei ω_a and $2\omega_a$. Nur der DC-Untergrund und die phasenabhängige DC-Komponente wird detektiert. Das mittels Tiefpass (LP= LowPass) gefilterte Signal lässt sich schreiben als

$$LP(S_1 S_2) = A_0 B_0 + A_1 B_1 \cos(\alpha - \beta) \quad (5)$$

Bei der *homodyne* Detektion wird dieses frequenzunabhängige (DC-) Signal bei mehreren relativen Phasen detektiert. Um die Fluoreszenz Lebensdauer zu messen, sind mindestens 3 verschiedene Phasenstellungen notwendig. Bereits mit zwei relativen Phasenstellungen kann die durch die Fluoreszenz-Lebensdauer induzierte

Phasenverschiebung bzw. die Demodulation als Kontrastparameter genutzt werden. [Clegg].

Heterodyne-Nachweis - Kreuzkorrelation

Ist $\omega_b = \omega_a + \Delta\omega$ (heterodyne), dann wird durch den Mischungsprozess ein hochfrequentes Signal bei der Summenfrequenz und ein Signal bei der Kreuzkorrelationsfrequenz $\Delta\omega$ erzeugt. Durch einen Tiefpassfilter werden wieder die Hochfrequenzkomponenten unterdrückt.

$$LP(S_1 S_2) = A_0 B_0 + A_1 B_1 \cos(\Delta\omega t + \alpha - \beta) \quad (6)$$

Bei dem Heterodyne Nachweis wird die Differenzfrequenz $\Delta\omega$ detektiert. Phasenlage und Modulationstiefe des Signals bei der Differenzfrequenz ermöglichen die Bestimmung der Lebensdauer. Typische Kreuzkorrelationsfrequenzen liegen im Bereich von einigen Hz bis zu etwa 100kHz.

Eine umfassendere Darstellung der Heterodyne-Technik findet man in Veröffentlichungen von E. Gratton et al. [Gratton][Gratton2]

Sowohl bei der homodyne als auch bei der heterodyne Detektion wird die hochfrequente Änderung gleichsam auf den niederfrequenten Frequenzbereich gespiegelt.

Bei Multiexponentiellem Abklingverhalten der Fluoreszenzemission sind die aus der Modulationstiefe und Phasenverschiebung bestimmten Lebensdauern unterschiedlich. Zur präzisen Messung der Lebensdauer muss deshalb die Anregungsfrequenz variiert werden [Gratton2].

Soll hingegen die Lebensdauer z.B. in einem bildgebenden Verfahren als Kontrastparameter genutzt werden, ist dies im allgemeinen nicht erforderlich. Häufig genügt z.B. die Darstellung der Phasenverschiebung bzw. Demodulation durch die Lebensdauer bzw. die damit berechneten Lebensdauern bei einer festen Modulationsfrequenz.

1.1 Confocal lifetime imaging, homodyne

Der konfokale Aufbau eines LSM wird zur Lebensdauerabbildung dahingehend verändert, daß

- die Anregungslichtquelle moduliert wird oder eine Puls laser eingesetzt wird
- die Verstärkung des Detektors (z.B. PMT) moduliert wird.
- ein elektronischer Phasenschieber eingesetzt wird, der die Einstellung der relativen Phasenlage von Lichtanregung und Detektion erlaubt. Das Schema mit den verwendeten Komponenten ist in Abbildung 1 dargestellt.

Realisierung 1:

mittels eines Synthesizers S getrieben durch einen Quarzkristall werden RF-Frequenzen im Bereich 10-100 MHz erzeugt. Der Ausgang des Synthesizers S wird einerseits über eine geschirmte Hochfrequenzleitung (z.B. über ein BNC Kabel) mit einem Phaseshifter/ Amplifier PA verbunden. Der Phaseshifter / Amplifier verstärkt ~~einerseits das hochfrequente Eingangssignal des Synthesizers – in der dargestellten~~ Realisierung auf eine Leistung von ca. 1.5W bei einem Widerstand von 50 W . Desweiteren kann mit dem PA die Phasenlage des verstärkten RF Signals variiert werden. Über eine Steuerleitung kann die rel. Phase des PA digital eingestellt werden – z.B durch eine Ansteuerung über eine serielle Schnittstelle eines PC. Das verstärkte RF-Signal wird einem modulierbaren PMT – z.B. dem PMT-Modul (H 6573) der Firma Hamamatsu ¹ – zugeführt. Die verstärkte RF-Spannung (etwa 25 V_{pp} / 50 W) wird im PMT zur 2. Dynode geführt und zur Modulation der Verstärkung des PMT benutzt. Zur Erzeugung eines definierten Tiefpaßfilters kann das Ausgangssignal des PMT's mittels handelsüblichem Low-Pass (LP) Filter geglättet werden. Die 3dB Grenzfrequenz f_g des LP filters ist dabei so zu wählen, daß

$$1/\text{Pixel-Dwelltime} \ll f_g \ll f_{\text{Laser}}$$

mit f_{Laser} = Laser-Modulationsfrequenz. Das so gefilterte Signal wird der Standard Detektionselektronik des LRM zugeführt. (zum Verständnis: prinzipiell z.B. einem ADC (Analog Digital Converter) der mit den xy- Scannern des LRM synchronisiert

¹ Eine detailliertere Darstellung der Funktionsweise ist als "Technical Information" zum H6573 der Fa. Hamamatsu erhältlich.

wird.)

Ein zweiter identischer Ausgang des Synthesizers S wird mit der Steuerungselektronik des Lichtmodulators M ebenfalls über eine Hochfrequenzleitung verbunden. Als Modulator kann beispielsweise ein akustooptischen Modulator im Laserstrahlengang (oder auch ein elektrooptischer Modulator) verwendet werden. Der Lichtmodulator ist Bestandteil des Lasermoduls des konfokalen LaserRasterMikroskops. Durch einen solchen Aufbau kann die relative Phasenlage von PA und Lichtmodulator M variiert werden. Die Frequenzen für M zur Modulation des Laserlichts und der PMT Verstärkungsspannung sind gleich. Die Phasenlage ist im allg. unterschiedlich. Mindestens die Phase eines RF-Ausgangs ist digital in etwa 1° Schritten einstellbar. In dem in Abbildung 1 dargestellten Fall wird die Phase der PMT Modulationsspannung durch den Phasenschieber in PA variiert.

Beschreibung der Funktionsweise und der damit verbundenen Vorteile der dargestellten Methode.

Mittels des üblichen LSM-Aufbaus wird das Licht der modulierten/gepulsten Laserlichtquelle über die Scanspiegel und der LSM-Scanoptik in die Objektebene fokussiert. Die Fluoreszenz wird wie beim konfokalen Zeiss LSM510 in Reflektionsrichtung über Farbteiler, Fokussierlinse etc. auf das Detektionspinhole fokussiert. Durch Rasterförmige Bewegung des Laserfokus über die Objektebene und synchronisierter Detektion im - jetzt modulierten - PMT entsteht ein konfokales Abbild der Objektebene. Durch die Verwendung der homodyne Technik ist das PMT Signal am Ausgang des LP-Filters (Abbildung 1) ein DC-Signal, das nur in Abhängigkeit der LaserSpot Position (Pixel) variiert. Durch Wiederholen des Scanvorgangs bei mehreren unterschiedlichen relativen Phasen von Lichtmodulator und Detektormodulation wird die Detektion des Fluoreszenz-Lebensdauerkontrasts bzw. die Messung der Fluoreszenz-Lebensdauer möglich. Der wesentliche Vorteil besteht darin, daß die übliche Datenaufnahmeeinheit des LRM verwendet werden kann. Die Berechnung des Lebensdauerkontrasts geschieht Bildweise.

Bildaufnahme zur Erzeugung des Lebensdauerkontrasts in einer konfokalen mikroskopischen Abbildung bzw. zur Darstellung der konfokalen Lebensdauervertelung von Farbstoffen.

- In einem ersten Schritt wird in der hier dargestellten Realisierung eine erste Phase des PMT-Detektors digital eingestellt. Die Einstellung geschieht wie oben dargestellt mit dem elektronischen Phasenschieber/Amplifier PA und das Resultierende DC-Signal des PMT's (nach üblicher Strom-Spannungswandlung und Analog - Digital- Wandlung) synchron mit dem Scanner mittels üblicher (LSM-) Auswertelektronik registriert und mittels eines Speichermediums im PC gespeichert.
- In mindestens einem zweiten Schritt wird das Vorgehen mit einer zweiten unterschiedlichen relativen Phasenlage wiederholt.

Mittels eines z.B. Computerbildschirms werden wahlweise die mindestens zwei digitalen Bilder ohne weitere Berechnung dargestellt.

Zur Darstellung werden auch die mit den nachfolgenden Algorithmen erzeugten Bilder auf dem Bildschirm dargestellt (Fourierentwicklung)

Die Fourierentwicklung ist gegeben durch

$$I(\varphi + \varphi_r) = a_0 + a_1 \cdot \sin(\varphi) + b_1 \cdot \cos(\varphi) \quad (7)$$

Mit der Fluoreszenzintensität eines Pixels I und den entsprechenden Fourierkoeffizienten a_0, a_1, b_1 .

$$\begin{aligned} a_0 &= \bar{I} = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} I\left(\varphi_r + n \frac{2\pi}{N}\right) \\ a_1 &= \frac{2}{N} \sum_{n=0}^{N-1} \sin\left(\frac{2\pi n}{N}\right) I\left(\varphi_r + n \frac{2\pi}{N}\right) \\ b_1 &= \frac{2}{N} \sum_{n=0}^{N-1} \cos\left(\frac{2\pi n}{N}\right) I\left(\varphi_r + n \frac{2\pi}{N}\right) \end{aligned} \quad (8)$$

Dabei sind a_0, a_1, b_0 die Fourierkoeffizienten (per pixel), $N \geq 2$ die Anzahl der gespeicherten Phasenbilder (bzw. Pixelintensitäten) $I=I(\phi)$

Die Modulationstiefe M_τ und die Phasenverschiebung durch die Lebensdauer ϕ_τ können durch die Fourierkoeffizienten ausgedrückt werden.

$$M_\tau = \frac{\sqrt{a_1^2 + b_1^2}}{a_0} = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}} \quad (9)$$

$$\phi_\tau = -1 \cdot \frac{a_1}{b_1} = \omega \tau \quad (10)$$

Die Modulationstiefe M wird pixelweise berechnet. $M=M(i,j) = M_{ij}$. (i,j , Pixelindices).

Ebenso die Phasenverschiebung $\phi = \phi(i,j) = \phi_{ij}$

Dargestellt wird auf dem Monitor das so pixelweise berechnete Abbild der Modulationstiefe M_{ij} und die Phasenverschiebung ϕ_{ij} .

Eine weitere Darstellungsart ist die τ - Abbildung, d.h. die durch Auflösung

Gleichungen (9) bzw. (10) nach t berechneten Lebensdauern $\tau(M)_{i,j}$ bzw. $\tau(\phi)_{i,j}$.

[Clegg]

$$\tau(M) = \frac{1}{\omega} \cdot \sqrt{\frac{1}{M^2} - 1} \quad (11)$$

$$\tau(\phi) = \frac{1}{\omega} \tan(\phi) \quad (12)$$

M bzw. ϕ werden über Gleichung (9) bzw. (10) und die mit Gleichung (8) bestimmten Fourierkoeffizienten a_0, a_1, b_1 berechnet.

Zur Erhöhung der Genauigkeit bei der Bestimmung der Phase können auch optimierte Algorithmen verwendet werden, die in einer Arbeit von Küchel, Phasenauswertung durch Faltung, 1989 dargestellt sind.

Realisierung 2:

Eine weitere Realisierung eines konfokalen Mikroskops mit Lebensdauerkontrast bzw. zur Messung der Lebendauerverteilung in einem konfokalen Schnittbild kann unter Verwendung von Pulslasern erfolgen. Geeignet sind z.B. Pulslaserdioden oder

andere z.B. fs-Lasersysteme (Ti:Saphir-Laser) z.B. mit nachgeschalteter Frequenzkonversionseinheit (z.B. Frequenzverdopplung/Verdreifachung). Bei Verwendung von PulsLasern kann auf die Erzeugung der RF-Treiberfrequenz mittels Synthesizer verzichtet werden. Stattdessen wird z.B. ein elektronisches Diodensignal des PulsLasers zur Verfügung gestellt (z.B. PD-Signal Out des fs/ps NIR-Lasers in Abbildung 1 oder ein äquivalenter Aufbau durch Austausch/Erweiterung des VIS-Lasermoduls z.B. mit einem ps-Diodenlaser etc.). Das so erzeugte RF-Signal der (ausreichend schnellen) Photodiode ist a priori synchronisiert mit der Laseranregung. Das RF-Signal kann analog dem RF-Signal eines Synthesizers verwendet werden, d.h. es wird der Phasenschieber/Amplifier PA Einheit am entsprechenden Eingang (über eine RF-Leitung) zur Verfügung gestellt. Das weitere Verfahren ist analog der Realisierung 1. Vorteilhaft ist hier einerseits die Verwendung einer pulsförmigen Lichtquelle und die damit einhergehende Verbesserung des Signal/Rauschverhältnisses in einem damit erzeugten Lebensdauerkontrasts im Vergleich zur sinusförmigen Modulation der Laseranregung in Realisierung 1 und der Verzicht auf einen Synthesizer zur

Erzeugung der RF-Frequenz. Detektiert wird die Fluoreszenz nach einer 1-Photonen Anregung (linear in der Anregungsintensität).

1.2 2-Photonen Confocal lifetime imaging, homodyne

Gegenstand dieses Kapitels ist die Kombination der 2-Photonen-Mikroskopie mit der Homodyne-Detektion zur Lebensdauerabbildung.

Die Kombination von Zeit-Auflösung und 2-Photonen-Mikroskopie wurde bereits von Gratton mit der sog. Heterodyne-Technik demonstriert [So]. Bei der Heterodyne Technik wird ein fs-Laser zur Fluoreszenz-Anregung in einem 2-Photonen-Mikroskop verwendet und der PMT-Detektor mit einer leicht unterschiedlichen Modulationsfrequenz betrieben. Die typische Wiederholrate von fs-Ti:Saphir-Lasern liegt im Bereich von 80MHz. In [So] wird zur Verstärkungsmodulation des PMT-Detektors eine Frequenz von 80MHz+25kHz verwendet. Dadurch entsteht eine Schwebung. Diese Schwebung wird mit einer ADC-Karte digitalisiert und abgetastet. Dadurch ist eine *Pixelweise* Erfassung der Phasenverschiebung von Anregung und Fluoreszenz möglich (Heterodyne-Verfahren).

In dem hier dargestellten Aufbau wird im Unterschied zu [So] nicht pixelweise sondern Bildweise die Phasenverschiebung bestimmt, d.h. Zuerst ein Bild bei einer relativen Phasenverschiebung ϕ_1 aufgenommen und gespeichert. In mindestens

einem weiteren Schritt wird danach bei einer weiteren unterschiedlichen relativen Phase ϕ_2 ein Bild erzeugt. (Homodyne Verfahren)

Das Berechnen der diversen Bilder zur Darstellung des Kontrasts geschieht analog Kapitel 1.1

Vorgehensweise

Eine gefärbte oder selbst fluoreszierende Probe wird zur Fluoreszenz über eine Zwei-Photonen-Absorption angeregt. Bei dem gepulsten Laser kann es sich z.B. um einen Ti:Saphir laser (auch evtl. frequenzverdoppelt, frequenzverdreifacht Summen oder Differenz frequenzgemischt etc.), eine ps-Laserdiode oder um einen z.B. mittels AOM oder EOM pulsförmig modulierten Laser handeln. Der physikalische Prozess ist in 1.1. eine 1-Photonenanregung in 1.2 eine 2-Photonenanregung (oder allg. Multiphotonenanregung). Zur Anregung der Fluoreszenz in der Realisierung nach Abbildung 1 wird ein fs-Ti:Saphirlaser verwendet. Die Wiederholrate des fs-Lasers liegt bei etwa 80 MHz (NLO-LSM, Fluoreszenz-Detektion).

Zur Detektion wird ein modulierbarer PMT-Detektor der Fa. Hamamatsu (H6573)

verwendet. Die sinusförmige Modulationsfrequenz wird über eine ECL-Logikschaltung aus einem Photodiodensignal des Lasers (fs-Mira, Fa. Coherent) generiert und mittels eines im Phaseshifters/Amplifiers PA integrierten RF-Verstärkers auf eine mittlere Leistung von 1.5 W @ 50 W verstärkt und steht am Ausgang RF out des PA zur Verfügung. Die Phase des generierten Sinus (und damit des verstärkten Sinus) ist auf etwa 1° einstellbar (analog Kapitel 1.1). Der elektronische Jitter ist $< 100\text{ps}$ (Abbildung 1), Phasenschieber/RF Amplifier). Mit dem verstärkten Sinus mit der der Laserwiederholrate entsprechenden Frequenz ($f_{\text{rep}}=f_{\text{mod}}$) wird die Verstärkung des PMT-Detektors moduliert. Dazu wird die verstärkte RF-Frequenz dem in Abbildung 1 als "RF-Modulation In" bezeichneten Eingangs des PMT-Moduls zur Verfügung gestellt. Der Strom am Ausgang des PMT-Detektors wird über einen passiven LP-Filter geglättet oder über eine Integrationsschaltung auf andere Art und Weise integriert. Das resultierende DC-Signal wird wieder der Detektionseinheit eines LRM zur Verfügung gestellt. Die weitere Datenaufnahme und Auswertung geschieht analog Kapitel 1.1

Der Unterschied zu 1.1 liegt darin, daß in einem Fall ein 2-Photonen (NLO) LSM mit der Lebensdauerabbildung kombiniert wird – d.h. die Fluoreszenzanregung

geschieht mit einem fs- oder ps- Puls laser. Ein wesentlicher Unterschied besteht also durch die Art der Fluoreszenzanregung (hier 2 oder allg. MehrPhotonen (>2) Anregung).

1.3 Anordnung zur phasenempfindlichen Fluoreszenzdetektion in einem Laser Scanning Mikroskop

Bei einer 2 / multi Photonen Anregung ist der Einsatz von effizienteren Detektionseinrichtungen aufgrund der tiefendiskriminierten Anregung möglich. Diese sind in der Literatur unter dem Sammelbegriff der nicht-descannten Detektion beschrieben.

Dies ist schematisch in Abb.2 dargestellt, die an der Scanlinse SL und dem Scanner von Abb.1 ansetzt und einen mikroskopischen Strahlengang darstellt, mit der Probe P, der Objektivlinse OL, dem Strahlteiler ST zur Einkopplung der Beleuchtung/ Auskopplung der von der Probe kommenden Strahlung sowie eine erste Tubuslinse TL1.

Über eine zweite Tubuslinse TL2 wird in einem Detektionsstrahlengang DE mit einem weiteren modulierbaren PMT direkt, d.h. nicht über den Scanstrahlengang, detektiert.

Dieser ist mit der Steuereinheit ST in Abb.1 und über diese mit weiteren Einheiten in Abb.1 verbunden.

Ein wesentlicher Nachteil dieser Detektionseinrichtungen besteht generell in der höheren Raumlichtempfindlichkeit. Da das Raumlicht im allgemeinen nicht/oder verschieden vom Anregungslicht moduliert ist, ist der Einsatz von

phasenempfindlichen Nachweiseinrichtungen zur Unterdrückung des Raumlichtes sinnvoll. Somit entfällt die aufwendige Kapselung der Detektionseinheit.

Anordnungen bei 1 und 2 / multi Photonen-Anregung wurden bereits oben beschrieben und sind vollständig auf einen phasenempfindlichen Detektor übertragbar. Jedoch besitzt beim phasenempfindlichen Nachweis das Referenzsignal (Anregungslicht) und das Meßsignal (Fluoreszenzsignal) die gleiche Modulation. Für die meist verwendeten TiSa Lasersysteme beträgt diese Modulation 80Mhz. Somit findet eine homodyne Detektion statt. Zum phasenempfindlichen Nachweis werden beide Signale in einem Multiplikator mit einer festen einstellbaren

Phasenbeziehung miteinander multipliziert. In einer vorteilhaften Anordnung fungiert als Multiplikator die erste Dynode eines modulierbaren Photomultipliers (H6573) .

Das Referenzsignal wird von dem oben dargestellten Phasenschieber/ RF Verstärker erzeugt. Die Clock für den Phasenschieber ist das Photodiodensignal des Puls lasers. Zusätzlich kann durch "Beaten" des Laserlichts mit einem optischen Modulator (AOM oder EOM, siehe Abbildung 1) die durch den Puls laser vorgegebene Wiederhol frequenz (Repetitions rate) auf einen variablen Beat-Frequenzbereich ausgedehnt werden. Die Beat-Frequenz wird durch einem Synthesizer mit einstellbarer Phase, der durch Triggersignale der Anregungslichtquelle gesteuert wird, bereitgestellt (siehe Abbildung 1) .

Die Phasenbeziehung zwischen Referenz- und Meßsignal wird so eingestellt, daß die Phasenverschiebung null beträgt. Somit findet eine Demodulation der Meßgröße statt. Man erhält somit ein DC bzw. niederfrequent moduliertes Meßsignal.

Störgrößen wie Raumlicht sind nach dem Multiplikator jedoch stark moduliert (wie Referenzsignal ca. 80Mhz). Durch den nachgeschalteten Tiefpaßfilter werden die hochmodulierten Anteile (Störgrößen) herausgefiltert und somit unterdrückt. Bsp für

ein Tiefpaßfilter ist die Nachweiselektronik eines herkömmlichen LSM.

Der Vorteil der beschriebenen Anordnung besteht darin, daß die Elektronik auf der Detektionsseite nur für Niederfrequente Signale ausgelegt werden muß, da die Demodulation bereits im Photomultiplier stattfindet.

Patentansprüche

1.

Verfahren zur Erfassung von Fluoreszenzerscheinungen in einem Mikroskop, wobei die Probe von einer modulierten und/ oder gepulsten Laserlichtquelle bestrahlt wird, und die Detektion der Fluoreszenz mindestens in zwei unterschiedlichen Phasenlagen des Detektors erfolgt.

2.

Verfahren nach Anspruch 1, wobei für die Phasenlagen jeweils ein Bild erzeugt wird

3.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die erzeugten Bilder oder aus diesen Bildern berechnete Bilder auf einem Monitor dargestellt werden.

4.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Beleuchtung und Detektion über ein Laser- Scanning - Mikroskop erfolgt.

5.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Detektion mit einem modulierbaren PMT erfolgt.

6.

Verfahren zur Erfassung von Fluoreszenzerscheinungen in einem Mikroskop, wobei die Probe von einer modulierten und/ oder gepulsten Laserlichtquelle bestrahlt wird, wobei ein dem modulierten und/ oder gepulsten Laser entsprechendes Referenzsignal und ein einer modulierten Detektion entsprechendes Meßsignal mit einer fest einstellbaren Phasenbeziehung miteinander multipliziert werden und das Ergebnis zur bildlichen Darstellung dient.

7.

Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Phasenbeziehung so eingestellt, daß die Phasenverschiebung Null beträgt .

8.

Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, mit nicht descannter Detektion.

9.

Anwendung eines Verfahrens gemäß einem der obengenannten Ansprüche auf die Multiphotonen Anregung von Fluoreszenzemission, insbesondere Zweiphotonenanregung

10.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, unter Verwendung eines mittels akustooptischen Modulators (AOM) modulierten cw-Lasers.

11.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, unter Verwendung eines mittels Pockelszelle modulierten cw-Lasers.

12.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, unter Verwendung eines PulsLasers welcher zusätzlich moduliert wird.

13.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, unter Verwendung eines PulsLasers welcher zusätzlich mittels AOM moduliert wird.

14.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, unter Verwendung eines PulsLasers welcher zusätzlich mittels einer Pockelszelle moduliert wird.

15.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, unter Verwendung zur Zeitauflösung von Multiphotonenprozessen wie Second Harmonic Generation an Oberflächen oder Zweiphotonenanregung.

16.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, unter Verwendung eines gepulsten Near Infrared (NIR) Lasers.

17.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, unter Verwendung eines gepulsten Near Infrared (NIR) Lasers mit nachfolgender Frequenzkonversion zur 1-Photonen Anregung.

18.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
unter Verwendung eines gepulsten Near Infrared (NIR) Lasers mit nachfolgender
Frequenzkonversion zur 1-Photonen Anregung von Fluoreszenz

19.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
unter Verwendung des phasensensitiven Nachweises zur Verbesserung des
Signal/Rausch Verhältnisses.

Literaturverzeichnis

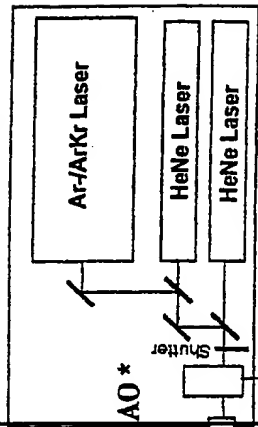
- [Wabnitz] H. Wabnitz
Verfahren zur Bestimmung von Calciumionenkonzentration in Zellen
Offenlegungsschrift DE 41 04 014, Anmeldetag 9.02.91
- [Gröbler] B. Gröbler
Vorrichtung zur Analyse und bildlichen Darstellung des bei einer
punktweisen Anregung eines Präparates durch Laserlicht entstehenden
zeitlichen Intensitätsverlaufs der Fluoreszenzstrahlung
Patent DE 36 14 359 C2
- [Müller] R. Müller, M. Sauer, C. Zander
System zur Unterscheidung fluoreszierender Molekülgruppen durch
zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung
Patent WO 98/09154
- [Han] K-T Han, M. Köllner, M. Sauer, S. Seeger, J. Wolfrum, C. Schmitt,
A. Schulz
Verfahren zur optischen Sortierung von Kunststoffen mittels
zeitaufgelöster Laserspektroskopie
Offenlegungsschrift DE 42 31 477 A1, Anmeldetag 19.09.92
-
- [Schbg] H. Schneckenburger, K. König, T. Dienersberger R. Hahn
Time - gated microscopic imaging and spectroscopy in medical
diagnosis and photobiology
Optical Engineering 33 (8) 2600 (1994)
- [Cubeddu] R. Cubeddu, G. Canti, A. Pifferi, P. Taroni, G. Valentini
A real time system for fluorescence lifetime imaging
SPIE 2976 (1997) 98
- [Dowling] K. Dowling, S.C.W. Hyde, N.P. Barry, J.C. Dainty, P.M.W. French
Two dimensional fluorescence lifetime imaging using a 5 kHz/110 ps
gated image intensifier
(WWW)
- [Clegg] P.C: Schneider, R.M. Clegg
Rapid acquisition, analysis and display of fluorescence lifetime-resolved
images for real-time applications
Rev. Sci. Instrum. 68 (11) 4107 (1997)
- [Gratton] E. Gratton, M. Limkeman
A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer
with picosecond resolution
Biophys. J. 44 (1983) 315
- [Gratton2] E. Gratton, D.M. Jameson, R.D. Hall
Multifrequency phase and modulation fluorometry
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 13 (1984) 105

- [So] P.T.C So, T. French, W.M. Yu, K.K. Berland, C.Y. Dong, E. Gratton
Time resolved fluorescence microscopy using two photon excitation
Bioimaging 3 (1995) 49
-
- [Goeppert] M. Göppert-Mayer
Ann. Physik 9, 273 (1931)
- [Wilson] T. Wilson
Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy
Academic Press, 1984
- [Wabnitz] H. Wabnitz
Verfahren zur Bestimmung von Calciumionenkonzentration in Zellen
Offenlegungsschrift DE 41 04 014, Anmeldetag 9.02.91
- [Gröbler] B. Gröbler
Vorrichtung zur Analyse und bildlichen Darstellung des bei einer
punktweisen Anregung eines Präparates durch Laserlicht entstehenden
zeitlichen Intensitätsverlaufs der Fluoreszenzstrahlung
Patent DE 36 14 359 C2
-
- [Müller] R. Müller, M. Sauer, C. Zander
System zur Unterscheidung fluoreszierender Molekülgruppen durch
zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung
Patent WO 98/09154
- [Han] K-T Han, M. Köllner, M. Sauer, S. Seeger, J. Wolfrum, C. Schmitt,
A. Schulz
Verfahren zur optischen Sortierung von Kunststoffen mittels
zeitaufgelöster Laserspektroskopie
Offenlegungsschrift DE 42 31 477 A1, Anmeldetag 19.09.92
- [Schbg] H. Schneckenburger, K. König, T. Dienersberger R. Hahn
Time - gated microscopic imaging and spectroscopy in medical
diagnosis and photobiology
Optical Engineering 33 (8) 2600 (1994)
- [Cubeddu] R. Cubeddu, G. Canti, A. Pifferi, P. Taroni, G. Valentini
A real time system for fluorescence lifetime imaging
SPIE 2976 (1997) 98
- [Dowling] K. Dowling, S.C.W. Hyde, N.P. Barry, J.C. Dainty, P.M.W. French
Two dimensional fluorescence lifetime imaging using a 5 kHz/110 ps
gated image intensifier
(WWW)
- [Clegg] P.C: Schneider, R.M. Clegg
Rapid acquisition, analysis and display of fluorescence lifetime-resolved
images for real-time applications

Rev. Sci. Instrum. 68 (11) 4107 (1997)

- [Gratton] E. Gratton, M. Limkeman
A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer
with picosecond resolution
Biophys. J. 44 (1983) 315
- [Gratton2] E. Gratton, D.M. Jameson, R.D. Hall
Multifrequency phase and modulation fluorometry
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 13 (1984) 105
- [So] P.T.C So, T. French, W.M. Yu, K.K. Berland, C.Y. Dong, E. Gratton
Time resolved fluorescence microscopy using two photon excitation
Bioimaging 3 (1995) 49
-

VIS Laser Module



AO* = AcoustoOptical Modulator(AOM)
or,
AcoustoOptical Tunable Filter (AOTF)

For Lifetime a RF-modulated AOM is used

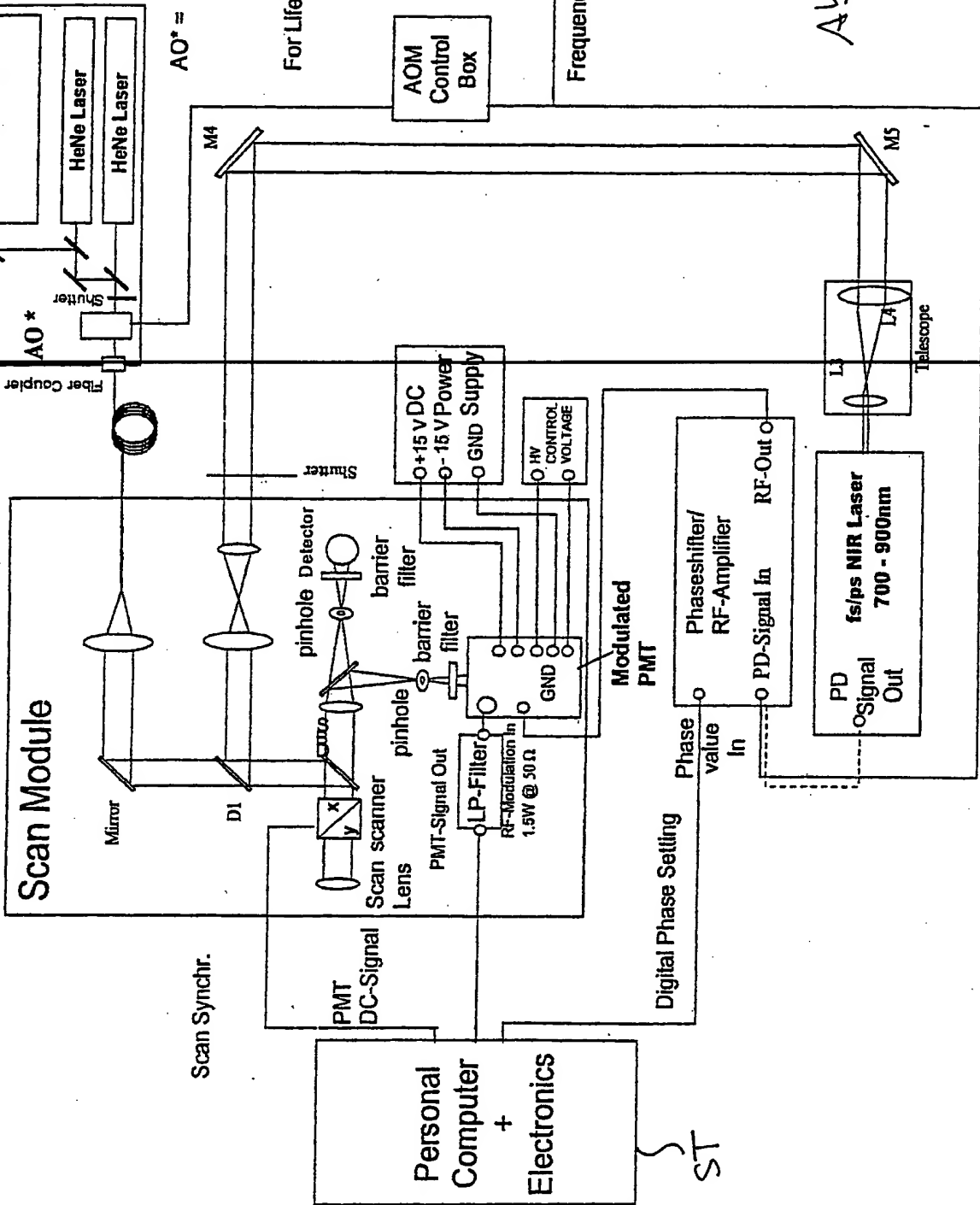
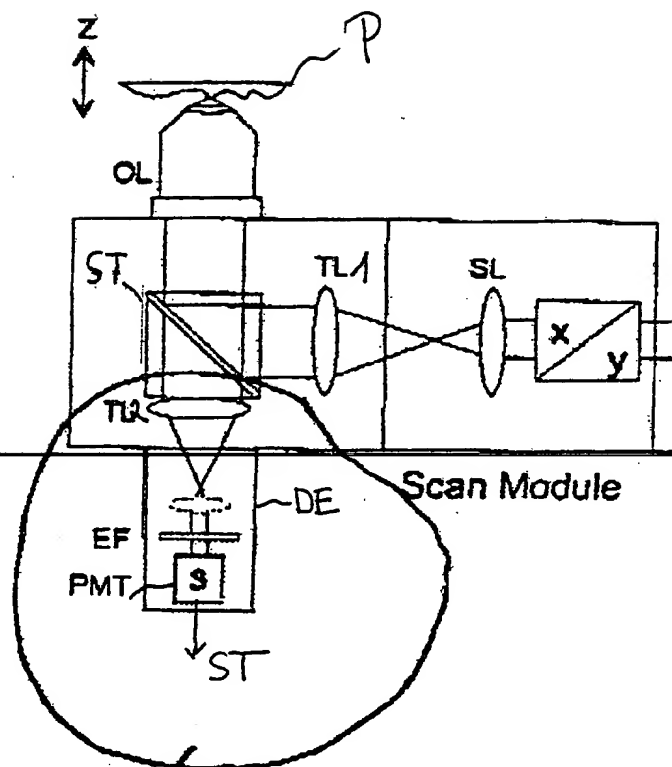


Abb. 1



nicht descaunt

Abb. 2